

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

**NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT**

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHAMOTO, Ichio  
 Yuasa and Hara  
 Section 206, New Otemachi Building  
 2-1, Otemachi 2-chome  
 Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004  
 JAPON

PATENT COOPERATION TREATY  
 2001. 1. 15  
 DIV.  
 JP

Date of mailing (day/month/year) 05 January 2001 (05.01.01)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference YCT-542	
International application No. PCT/JP00/07491	International filing date (day/month/year) 26 October 2000 (26.10.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 26 October 1999 (26.10.99)
Applicant <b>SUNTORY LIMITED et al</b>	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
26 Octo 1999 (26.10.99)	11/304185	JP	15 Dece 2000 (15.12.00)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Magda BOUACHA  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHAMOTO, Ichio  
Yuasa and Hara  
Section 206, New Otemachi Building  
2-1, Otemachi 2-chome  
Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004  
JAPON

✓

Date of mailing (day/month/year) 03 May 2001 (03.05.01)		
Applicant's or agent's file reference YCT-542		
International application No. PCT/JP00/07491	International filing date (day/month/year) 26 October 2000 (26.10.00)	Priority date (day/month/year) 26 October 1999 (26.10.99)
Applicant SUNTORY LIMITED et al		

IMPORTANT NOTICE

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
AU,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:  
CA,EP

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on  
03 May 2001 (03.05.01) under No. WO 01/31000

**REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)**

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

**REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))**

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer  J. Zahra  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---



(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2001年5月3日 (03.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/31000 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/11, 1/19, C12C 11/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/07491

(22) 国際出願日: 2000年10月26日 (26.10.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/304185  
1999年10月26日 (26.10.1999) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): サントリー株式会社 (SUNTORY LIMITED) [JP/JP]; 〒530-8203 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 芦刈俊彦 (ASHIKARI, Toshihiko) [JP/JP]; 〒569-1020 大阪府高槻市高見台11-26 Osaka (JP). 落合美佐 (OCHIAI, Misa) [JP/JP]; 〒618-0001 大阪府三島郡島本町山崎四丁目20-5-401 Osaka (JP).

(74) 代理人: 杜本一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(国内): AU, CA, US.

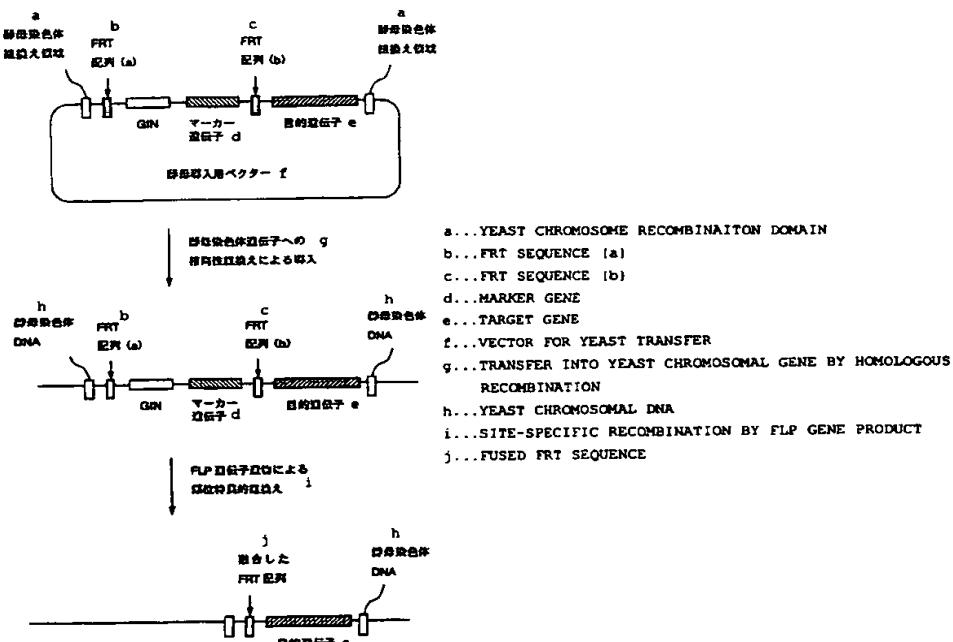
(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開図類:  
— 国際調査報告書

[統葉有]

(54) Title: METHOD OF BREEDING YEAST

(54) 発明の名称: 酵母の育種方法



WO 01/31000 A1

(57) Abstract: A DNA construct consisting of: (1) a screening marker gene; (2) a proliferation inhibitory sequence which can be induced with galactose; (3) a pair of FRT sequences located in such a direction that (1) and (2) are sandwiched between them; and (4) a DNA which can be recombined with yeast chromosomal DNAs provided in both sides of (3); characterized in that the FRT sequences contain the following sequence: 5'-GAAGTTCCTATACTTTCTAGA GAATAGGAACCTTC-3' (SEQ ID NO:1) inverted repeat spacer inverted repeat sequence (1) sequence sequence (2) or a sequence substantially identical therewith

[統葉有]



- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正登録の際には再公開される。 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

and, in each of the pairing FRT sequences, one to six bases have been deleted from the distal side of the spacer sequence in the inverted repeat sequence in the distal side of the screening marker gene and the proliferation inhibitory sequence sandwiched between them; a method of transforming a yeast belonging to the genus *Saccharomyces* by using the same; a yeast belonging to the genus *Saccharomyces* transformed thereby; and a process for producing beer characterized by using this yeast belonging to the genus *Saccharomyces*.

(57) 要約:

- (1) 選択マーカー遺伝子、
- (2) ガラクトースで誘導可能な増殖阻害配列、
- (3) (1) と (2) とを挟む同方向に配置された 1 対の FRT 配列、及び
- (4) (3) の両側に配置される酵母染色体 DNA との間で組換え可能な DNA 断片、

からなる DNA 構成物であって、該 FRT 配列が次の配列：

5' — GAAGTTCCCTATAAC TTTCTAGA GAATAGGAACTTC — 3' (配列番号：1)

逆向き反復	スペーサー	逆向き反復
配列 (1)	配列	配列 (2)

を含んで成るか又はこれと実質的に同一な配列を含んで成り、但し該 1 対の FRT 配列のそれぞれは、間に挟まれた選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列から遠位の側の逆向き反復配列において、スペーサー配列から遠位の側において少なくとも 1 個以上、6 個以下の塩基が欠失していることを特徴とする DNA 構成物、及びこれを用いるサッカロマイセス属酵母の形質転換方法、該方法で形質転換されたサッカロマイセス属酵母、ならびに該サッカロマイセス属酵母を用いることを特徴とするビールの製造方法。

明細書  
酵母の育種方法

技術分野

5 本発明は、酵母の部位特異的組換えを用いて、選択マーカー遺伝子が欠失した形質転換体を作製する方法に関する。この方法を利用することにより、目的とする遺伝子を酵母に導入した後に、選択マーカー遺伝子を有さず、かつ好ましい形質を導入した酵母の形質転換体を得ることができる。本発明の形質転換方法によって得られた酵母は、サッカロマイセス属酵母を利用する酒類製造やパン製造、  
10 特にビール製造に使用することができる。

背景技術

酵母においては、現在までに多くの遺伝子導入方法が報告されているが、遺伝子導入効率が低いため、それらのいずれの方法においても形質転換体を選択する  
15 ためには選択マーカーが必要である。選択マーカーとしては栄養要求性の回復などがあるが、酵母への栄養要求性の付与は困難である場合が多いため、一般的には抗生物質などの薬剤に対する耐性遺伝子が用いられている。しかしながら、酵母で効率よく利用できる薬剤耐性遺伝子の種類が少ないと同一株を繰り返し形質転換するためには選択マーカー遺伝子を取り除き再利用を行うことが望ま  
20 れる。また、組換え体の実用化における安全性の面などからも、形質転換体から選択マーカー遺伝子を取り除くことが望ましい。

これらの問題を解決するために形質転換体から選択マーカー遺伝子を除く方法が開発されている。部位特異的な組換えを利用した方法がその一つである。

部位特異的組換えは、組換えを行う酵素がその酵素が認識する特異的な塩基配列である 2 個の認識配列に作用し、該認識配列間で組換えを引き起こすことにより起こる。これらの組換えは 1 対の認識配列の配置により、欠失、挿入、逆位等の現象を引き起こす。部位特異的な組換えとしてバクテリオファージ P1 由来の Cre/lox、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の FLP/FRT、醤油酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) 由来の R/RS、そして、バクテリオファージ Mu

由来の Gin/gix の 4 つが知られている（それぞれは組換えを行う酵素とその酵素が認識する特異的な塩基配列の組合せで示してある）。

出芽酵母は細胞中に  $2\mu\text{m}$  プラスミドと呼ばれる環状 2 本鎖 DNA を持つことが知られており、 $2\mu\text{m}$  プラスミドには部位特異的組換え機構が存在することが明らかになっている (Broach,J.R., Guarascio,V.R. and Jayaram,M., Cell, 29, 227-234, 1982)。 $2\mu\text{m}$  プラスミドは 6318bp からなる環状プラスミドで、分子中に 599bp からなる 1 対の逆向き反復配列を持ち、この逆向き反復配列間で部位特異的組換えをおこすことが知られている。この逆向き反復配列間での組換え部位は、8bp のスペーサー配列と、それを挟む 13bp の 1 つのミスマッチを含む短い逆向き反復配列から構成され (FRT 配列)、さらに片側には 1 個の 13bp の反復配列が続く。部位特異的組換えは、プラスミド自身にコードされた FLP 遺伝子より発現される組換え酵素 (Flp 蛋白質) が、逆向き反復配列内の組換え部位に存在する特異的な塩基配列である FRT 配列に作用することによって起こる。

なお、FRT 配列としては、8bp のスペーサー配列と 13bp の逆向き反復配列からなる 34bp の配列が知られている (J.F.Senecoff, R.C.Bruckner, and M.M.Cox, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 82, 7270-7274, 1985)。しかしながら、この 34bp の FRT 配列を用いて部位特異的組換えを行うと、組換え後に染色体上に組換え酵素の認識配列が残り、目的としない組換えを誘導する可能性があることから実用的ではない。

そこで、組換え後に染色体上に残る認識配列間での組換えを抑える必要があった。

組換え酵素とその酵素の認識配列による部位特異的な組換えを用いた選択マークー遺伝子の切り出しについてはいくつか報告されており、たとえば、出芽酵母で FLP/FRT の系を利用した選択マークー遺伝子の切り出しが報告されている (F.Storici, M.Coglievina and C.V.Bruschi, Yeast, 15, 271-283, 1999)。Storici らは、kanMX4 遺伝子または URA3KI 遺伝子を選択マークー遺伝子とし、 $2\mu\text{m}$  プラスミドをもつ Cir<sup>+</sup> 株の場合には、同方向に繰り返し配置した FRT 配列の間に選択マークー遺伝子を、一方  $2\mu\text{m}$  プラスミドをもたない Cir<sup>0</sup> 株の場合には同様に配置した FRT 配列の間に選択マークー遺伝子と共に FLP 遺伝子を組み込

み出芽酵母を形質転換した。得られた形質転換株を非選択培地で培養することにより FRT 配列間での組換えを引き起こし、選択マーカー遺伝子を除去することに成功した。彼らは、FRT 配列のコアの部分（8bp のスペーサー配列部分）に塩基置換を導入すると、同じ塩基置換を持つものどうしの組換えは起こるが別の塩基置換を持つものとの組換えは抑えられることを利用し、繰り返し形質転換と選択マーカー遺伝子の切り出しを行う際には、そのたびごとに別の塩基置換をもつ FRT 配列を利用することにより、染色体上に残る FRT 配列間での目的としない組換えを抑えた。しかしながら、彼らの方法では、選択マーカー遺伝子の切り出し効率は 0.01% – 1.39% と非常に低く、選択マーカー遺伝子が除去された株を選択するのは容易ではない。さらに、FRT 配列のコアの部分の塩基置換も数が限られており、何回も利用できるわけではない。

また、出芽酵母で、醤油酵母由来の部位特異的組換えの系である R/RS 系を利用した方法が開発されている（特開平 10-66587 号公報）。同公報によると、同方向に繰り返し配置した RS 配列の間に選択マーカー遺伝子およびガラクトースにより誘導できるプロモーターに連結した R 遺伝子を組み込み出芽酵母を形質転換した。その際、R 遺伝子と選択マーカー遺伝子とを挟む 1 対の RS 配列をそれぞれ外側から数塩基欠失させることにより、組換え後に残る RS 配列による目的としない組換えを抑えた。しかしながら、この方法では、外来の組換え酵素の遺伝子（R 遺伝子）を導入する必要があった。また、形質転換する酵母の株の違いによって選択マーカー遺伝子の切り出し効率にバラツキがあり、特に実用株である醸造用酵母や野生型酵母では選択マーカー遺伝子の切り出し効率が低いため選択マーカー遺伝子が除去された株を選択するのは容易ではない。

一方、出芽酵母では高発現させると細胞の増殖を阻害する配列(増殖阻害配列)があることが報告されている。こうした配列を利用した選択マーカー遺伝子の切り出しは既に報告されている（M. Kawahata et. al., Yeast 15, 1-10, 1999）。Kawahata らは、同方向に繰り返し配置した大腸菌由来の約 1.2kb の hisG 間に、URA3 遺伝子と、ガラクトースで誘導可能なプロモーターに増殖阻害配列を連結し形質転換に用いた。染色体に挿入後、ガラクトースを含む培地で培養することにより、96%以上の効率で選択マーカー遺伝子を除去することに成功した。しか

しながら、選択マーカー遺伝子の切り出しには相同組換えを利用しているため、染色体上に選択マーカー遺伝子の切り出し痕として残る不必要的配列が長く、実用的でない。

そこで、本発明者らは、選択マーカー遺伝子を消失し、かつ望ましい目的遺伝子を効率よく発現する形質転換体を作製する方法を提供することを課題とした。  
また、このようにして作製された形質転換酵母の酒類製造やパン製造、特にビール製造への利用を検討することも本発明の課題である。

### 発明の開示

10 上記課題を解決するために、本発明者らは、FRT 配列と増殖阻害配列を組み合わせることにより、選択マーカー遺伝子を消失した酵母の形質転換体を作製する方法を見出した。

具体的には、本発明は、

- (1) 選択マーカー遺伝子、  
15 (2) ガラクトースで誘導可能な増殖阻害配列、  
(3) (1) と (2) とを挟む同方向に配置された 1 対の FRT 配列、及び  
(4) (3) の両側に配置される酵母染色体 DNA との間で組換え可能な DNA 断片、

からなる DNA 構成物であって、該 FRT 配列が次の配列：

20 5' - GAAGTTCCCTATAAC TTTCTAGA GAATAGGAACTTC - 3'      (配列番号：1)  
逆向き反復      スペーサー      逆向き反復  
配列 (1)      配列      配列 (2)

25 を含んで成るか又はこれと実質的に同一な配列を含んで成り、但し該 1 対の FRT 配列のそれぞれは、間に挟まれた選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列から遠位の側の逆向き反復配列において、スペーサー配列から遠位の側において少なくとも 1 個以上、6 個以下の塩基が消失していることを特徴とする DNA 構成物を提供する。

また、本発明は、

(1) 前記 DNA 構成物を酵母細胞に導入し、該 DNA 構成物に存在する、酵母染色体 DNA との間で組換え可能な DNA 断片と、酵母染色体 DNA との間の組換えにより、該 DNA 構成物を酵母染色体に組み込み、

5 (2) 該 DNA 構成物に含まれている選択マーカー遺伝子の発現により、該 DNA 構成物が導入された酵母細胞を選択し、

(3) 非選択培地で培養し、該 DNA 構成物に含まれる 1 対の FRT 配列間において組換えを起こさせることにより、選択マーカー遺伝子を切除し、

(4) ガラクトースを含む培地で培養し、増殖可能な酵母細胞を選択する、

10 ことを特徴とするサッカロマイセス属酵母の形質転換方法を提供する。

また、本発明は、前記形質転換方法を用いることにより得られたサッカロマイセス属酵母を提供する。

さらに本発明は、前記サッカロマイセス属酵母を用いることを特徴とするビールの製造方法を提供する。

15 さらに本発明は、前記製法により得られるビールを提供する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、野生型 FRT 配列を含むプラスミド pPUFRT1-101 の構築を示す概略図である。

20 図 2 は、プラスミド pPUFRT3-103 の構築を示す概略図である。

図 3 は、実施例 1 で作製した DNA 構成物に用いた 1 対の FRT 配列とこれから組換えによって生じる再構成された配列を示す。

図 4 は、プラスミド pUGINFRT3-103 の構築を示す概略図である。

図 5 A 及び 5 B は、プラスミド pPPGINFRT3 の構築を示す概略図である。

25 図 6 は、本発明の DNA 構成物を用いた部位特異的組換えによる選択マーカー遺伝子の除去を示す概略図である。

図 7 は、選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列から見て外側にあたる数個の塩基がそれぞれ欠失した 1 対の FRT 配列を用いることにより、組換え後に残存する配列が FLP 遺伝子産物により認識されにくい配列となることを示す概略図であ

る。

### 発明を実施するための最良の形態

本発明の DNA 構成物、及びこれを用いるサッカロマイセス属酵母の形質転換

5 方法の概略を図 6 に示す。図 6 に示すように、本発明の DNA 構成物においては、

- (1) 選択マーカー遺伝子、
- (2) ガラクトースで誘導可能な増殖阻害配列 (G I N) 、
- (3) (1) と (2) とを挟む同方向に配置された 1 対の FRT 配列、及び
- (4) (3) の両側に配置される酵母染色体 DNA との間で組換え可能な DNA

10 断片、

からなる。

本発明の DNA 構成物中の FRT 配列は次の配列：

5' - GAAGTTCCCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAACCTTC - 3' (配列番号：1)

15 逆向き反復      スペーサー      逆向き反復  
配列 (1)      配列      配列 (2)

20 を含んで成るか又はこれと実質的に同一な配列を含んで成り、但し該 1 対の FRT 配列のそれぞれは、間に挟まれた選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列から遠位の側の逆向き反復配列において、スペーサー配列から遠位の側において少なくとも 1 個以上、6 個以下の塩基が欠失している。欠失している塩基の数は 1 対の FRT 配列のそれぞれで同じであっても異なっていてもよい。

25 すなわち、1 対の FRT 配列のうちの、図 6 における FRT 配列(a) は、選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列から遠位の側の逆向き反復配列において、スペーサー配列から遠位の側の 1 個以上、6 個以下の塩基が欠失している。

また、他方の FRT 配列は (図 6 における FRT 配列(b)) は、選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列から遠位の側の逆向き反復配列において、スペーサー配列から遠位の側の 1 個以上、6 個以下の塩基が欠失している。

本発明の DNA 構成物中の FRT 配列において、上記の意味における欠失するこ

とができる塩基数は、スペーサー配列に隣接する反復配列を構成する塩基（計 1 3 個）の内の 1 個以上、6 個以下であり、好ましくは 2 個以上、5 個以下であり、より好ましくは 3 個以上、5 個以下である。塩基が 6 個より多く欠失すると、DNA 組換えの可能性が極めて低くなり好ましくない。

5 本発明で用いる FRT 配列は、配列番号：1 に示す配列を含んで成るが、その一方の側の逆向き反復配列において、上述したように短縮されている。しかしながら、短縮された逆向き反復配列とは反対側の逆向き反復配列では 1 3 個の塩基がそのまま維持されていることが望ましく、さらに反復配列が連結されて延長されていてもよい。天然の FRT 配列においては、配列番号：1 に示す配列の片側 10 が、さらに 1 個の 1 3 b p の反復配列により延長された構造を有しており、本発明の FRT 配列においても、前記のごとく短縮された逆向き反復配列の側とは反対の逆向き反復配列は、天然配列と同様に反復していてもよい。

本発明で用いる FRT 配列は、上に定義した配列を有するものの他に、それと実質的に同じ塩基配列を有するものも含まれる。ここで「実質的に同じ配列」とは、Flp タンパク質によって認識され、FRT 配列間で組換えを起こすことができる配列であり、例えば上記に定義した配列に対して、1 又は数個の塩基の置換、欠失又は付加により修飾されている塩基配列を意味する。

例えば本発明の一例である DNA 構成物の構造を示す pUGINFRT3-103（図 4）では、1 対の FRT 配列のうちの、図 4 における FRT3（配列番号：5）は、選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列から遠位の側の逆向き反復配列において、スペーサー配列から遠位の側の 5 個の塩基が欠失しており、また選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列に近位の側の逆向き反復配列は 1 3 個の塩基が維持されている。

なお、図 4 に示す pUGINFRT3-103 において、FRT3、FRT103 の近くに記載している矢印はその方向性を示しており、具体的には、図 4 における FRT3 は、図 3 における FRT3 の 3' 側が PRA 側にあり、図 3 における 5' 側が URA3 側に挿入されている。また、図 4 における FRT103 は、図 3 における FRT103 の 3' 側が GIN11M86 側にあり、図 3 における 5' 側が PRA-tail 側に挿入されていることを示している。

また、他方の FRT 配列は（図 4 における FRT103）（配列番号：6）は、選

選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列から遠位の側の逆向き反復配列において、スペーサー配列から遠位の側の 4 個の塩基が欠失しており、また選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列に近位の側の逆向き反復配列は 13 個の塩基が維持されている。

上記のごとき 1 対の FRT 配列を有する DNA 構成物に対して、酵母のもつ  $2 \mu m$  プラスミド上の FLP 遺伝子により発現される組換え酵素が作用すれば、DNA の組換えが生ずる。

その結果、選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列が除去されると共に、一方の FRT 配列（例えば FRT3）の短縮された側の部分と、他方の FRT 配列（例えば、FRT103）の短縮された側の部分とが融合した配列が再構成される。この再構成された配列は、スペーサー配列の両端に短縮された逆向き反復配列を有しており、例えば FRT3 配列と FRT103 配列とからは、図 3 に示す FRT3W 配列（配列番号：7）が生ずる。

下記の実施例で作製した DNA 構成物に用いた 1 対の FRT 配列とこれから組換えによって生じる再構成された配列を図 3 に例示する。このうち、1 対の FRT 配列が FRT2 と FRT102 の組合せ、及び FRT3 と FRT103 の組合せは本発明の DNA 構成物に使用する好ましい 1 対の FRT 配列である。しかし、FRT4 及び FRT104 はそれぞれ、選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列から遠位の側の逆向き反復配列において、スペーサー配列から遠位の側の 7 個の塩基が欠失しており、これを 1 対の FRT 配列として用いた DNA 構成物では組換え効率が低いことが判明した。

実施例 1 に示すごとく、スペーサー配列を中心にして、一方の側の逆向き反復配列のみが短縮された FRT 配列は酵母のもつ  $2 \mu m$  プラスミド上の FLP 遺伝子産物の作用によって組換えを生ずるが、両側の逆向き反復配列が短縮された場合（例えば、FRT3W 配列）には FLP 遺伝子産物の作用による組換が生じにくくなる。

本発明の DNA 構成物では、上記 FRT 配列とガラクトースで誘導可能な増殖阻害配列とを組み合わせることにより、選択マーカー遺伝子を切除し、かつガラクトースを含む培地で増殖可能な酵母細胞を選択することが可能となる。

本発明で用いるガラクトースで誘導可能な増殖阻害配列とは、ガラクトースを

含む培地で培養したときに細胞の増殖を阻害する RNA 又は蛋白質をコードする配列をいう。例えば、本実施例において使用した GIN11 は、サッカロマイセス酵母の細胞内で高発現させることにより、細胞の増殖を阻害する DNA 断片の一つとして単離された (R.Akada et. al., Mol. Gen. Genet. 254, 267-274, 1997)。

- 5 GIN11 以外にも、高発現させることにより細胞増殖を抑制あるいは阻害する遺伝子あるいは DNA 配列を用いることも可能である。例えば、GIN4、URA2、BN11、PSP1、BOI1、RBP1、SAC7、TPK3、PRK1 (R. Akada et al., Mol. Gen. Genet. 254, 267-274, 1997)、ACT1、ARF2、ATE1、AUA1、ERG6、HSF1、MCM1、NHP6A、NTH1、RHO1、SEC17、SIR1、SRP40 (C. Espinet et al., Yeast, 11, 10 25-32, 1995) 等が使用できる。

増殖阻害配列を本発明の DNA 構成物に組み込むには、GAL1 プロモーターなどの適当なプロモーターに連結して導入する。

選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列は 1 対の FRT 配列に挟まれて存在するが、選択マーカー遺伝子と増殖阻害配列はどちらが上流側にあってもよい。

- 15 また、選択マーカー遺伝子としては、酵母において使用される任意の選択マーカー遺伝子を用いることができ、例えばゲネチシン含有培地で選択可能なゲネチシン耐性遺伝子やその他にセルレニン耐性遺伝子、シクロヘキシミド耐性遺伝子等の薬剤耐性選択マーカー遺伝子、あるいは URA3 遺伝子、LEU2 遺伝子、TRP1 遺伝子、HIS4 遺伝子等の栄養要求性に基づく選択マーカー遺伝子を使用することができる。後述する実施例に示すように、本発明においては、栄養要求性に基づく選択マーカー遺伝子であっても、薬剤耐性に基づく選択マーカー遺伝子であっても、本発明の DNA 構成物に含まれる 1 対の FRT 配列間において組換えを起こさせることにより、選択マーカー遺伝子を効率よく切除することができた。
- 20

- 酵母染色体 DNA との間で組換え可能な DNA 断片は、酵母染色体上の遺伝子の一部分と相同性を有する DNA 断片であり、酵母染色体上の遺伝子としては、その遺伝子が破壊されても酵母の増殖が阻害されない遺伝子であって、例えばプロテアーゼ A 遺伝子、リボソーム DNA 遺伝子、CYC7 遺伝子等、が挙げられる。

本発明では、酵母染色体 DNA との間で組換え可能な DNA 断片と、その近傍

にある FRT 配列の間に、目的遺伝子が挿入されていることが好ましい。

本発明の DNA 構成物は当業者に公知の方法により作製することができ、具体的な手法は例えば Sambrook らの Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に記載のものを用いることができる。

5 本発明はまた、上記の DNA 構成物を用いる、サッカロマイセス属酵母の形質転換方法を提供する。この方法においては、

(1) 前記 DNA 構成物を酵母細胞に導入し、該 DNA 構成物に存在する、酵母染色体 DNA との間で組換え可能な DNA 断片と、酵母染色体 DNA との間の組換えにより、該 DNA 構成物を酵母染色体に組み込み、

10 (2) 該 DNA 構成物に含まれている選択マーカー遺伝子の発現により、該 DNA 構成物が導入された酵母細胞を選択し、

(3) 非選択培地で培養し、該 DNA 構成物に含まれる 1 対の FRT 配列間において組換えを起こさせることにより、選択マーカー遺伝子を切除し、

(4) ガラクトースを含む培地で培養し、増殖可能な酵母細胞を選択する。

15 この形質転換操作は複数回反復することができ、これにより、下記に説明するように、同一の選択マーカー遺伝子を用いて複数の目的遺伝子を酵母の染色体に導入することができる。上記の方法において、DNA 構成物はそれ自体からなる、もしくはそれ自体を含む DNA 断片として、又は該 DNA 構成物が挿入されたプラスミドの形で酵母細胞中に導入することができる。この導入は、すでに知られている任意の方法、例えば酢酸リチウム法、塩化リチウム法、プロトプラスト法等により行うことができる。

サッカロマイセス属酵母としては、サッカロマイセス・セレビシエ、サッカロマイセス・カールスベンゲンシス、サッカロマイセス・バイアヌス、サッカロマイセス・パストリアヌス、サッカロマイセス・ディアスタチカス等が使用できる。

25 次いで形質転換体から DNA 構成物に含まれている選択マーカー遺伝子を発現させることにより、該 DNA 構成物が導入された酵母細胞を選択する。次にこれを非選択培地、例えば完全栄養培地であるYPD 培地（グルコース 2%、ペプトン 2%、酵母エキス 2%）で培養すると、酵母細胞内 FLP 遺伝子の発現産物である Flp 組換え酵素の働きにより 1 対の FRT 配列間において組換えを起こす細

胞がある。一方、FRT 配列間で組換えがおこらなかった細胞はガラクトースを含む培地で培養することにより増殖阻害配列の発現が誘導され増殖が阻害される。したがって、ガラクトースを含む培地で増殖できる細胞は染色体上に挿入された FRT 配列間で組換えがおこり、その間に挿入されていた選択マーカー遺伝子および増殖阻害配列が除去されたものである。これによって、好ましい酵母形質転換体であって、かつ選択マーカー遺伝子が除去された酵母細胞を得ることができる。

本発明の方法では、同方向に配置した FRT 配列の間に発現可能な選択マーカー遺伝子とガラクトースで誘導可能な増殖阻害配列を配置した DNA 構成物、例えば DNA 断片、プラスミド、その他のベクター等を用いて形質転換を行うが、10 その際、前記のごとく定義される 1 対の FRT 配列を用いることにより、組換え後に残存する配列が FLP 遺伝子産物により認識されにくい配列になり、目的としない組換えを誘導する可能性が低減し、形質転換体から選択マーカー遺伝子を特異的に除去し、目的とする形質転換体を得ることができる（図 7 参照）。本発明では上述したように、FLP 遺伝子は酵母自体の  $2 \mu m$  プラスミド上に存在する 15 ために、外来の組換え酵素の遺伝子を導入する必要がない。

本発明の方法を用いることにより、後代をとったり、再度の形質転換や交配などの操作を伴うことなく、選択マーカー遺伝子の除去が可能となった。また、選択マーカー遺伝子に関する安全性評価を省略することも可能になり、開発期間を短縮でき、開発コストも低減することができる。さらに、選択マーカー遺伝子が 20 欠失した形質転換体を用いて、再び同じ選択マーカー遺伝子を用いた形質転換が可能となり、複数の遺伝子を繰り返し導入することも可能となる。本発明の方法は、例えば有用な蛋白質をコードする目的遺伝子を酵母の染色体に導入する場合に、次のようにして用いることができる。

本発明の DNA 構成物においては、前記のごとく配置された 1 対の FRT 配列を 25 含んで成る DNA 断片の両端に、1 対の FRT 配列を挟むように、酵母染色体 DNA との間で組換え可能な DNA 断片（酵母染色体組換え領域と称する場合がある）が直接に又は間接に連結されている。FRT 配列と右又は左ボーダーとが間接的に連結されている場合には、それらの間に酵母の染色体に組み込むべき目的とする遺伝子が挿入されている（図 6 を参照のこと）。この DNA 構成物が酵母に導入

されれば、この DNA 構成物の酵母染色体組換え領域と酵母の対応する染色体遺伝子との間で組換えが生じ、DNA 構成物が全体として酵母染色体 DNA に組み込まれる。

次に、この酵母を培養すれば酵母自体の  $2 \mu\text{m}$  プラスミド上の FLP 遺伝子産物が生産され、これが FRT 配列に作用して、1 対の FRT 配列間で前記のごとき部位特異的組換えが生じ、これら 1 対の FRT 配列に挟まれた領域（選択マーカー遺伝子及び増殖阻害配列を含む領域）が除去され、組換えにより融合した（両端が短縮された）FRT 配列と酵母染色体組換え領域との間の目的遺伝子が酵母染色体遺伝子に組み込まれたまま残る。そして、上記の両端が短縮された FRT 配列はもはや組換えを生じないから、挿入された目的遺伝子は酵母染色体中に安定に維持される。

すなわち、本発明によれば、目的遺伝子が酵母染色体に挿入された後選択マーカー遺伝子（及び増殖阻害配列）が除去され、且つ FRT 配列が機能できなくなる。従って、目的遺伝子を 1 回導入した後、同じ選択マーカー遺伝子を含有する遺伝子導入用ベクター（本発明の DNA 構成物）を用いて、さらなる目的遺伝子の導入を行うことができる。

本発明はさらに、このような方法を用いて、目的遺伝子が安定に導入された酵母を用いることを特徴とする酒類、特にビールの製造方法を提供する。目的遺伝子としてはビールの品質や醸造工程を改良するための種々の遺伝子であってよい。

例えば、ビール醸造では酵母の代謝により好ましくない香味（オフフレーバー）が生成される。それらの生成量は醸造用酵母の特定の遺伝子発現を調節することにより、低減もしくは消失させることが可能となる。例えば、ビールのオフフレーバーの例として硫化水素や VDK（ダイアセチルと 2,3-ペントジオン）が挙げられる。硫化水素は硫黄同化経路の中間代謝物であって、一般的なビール酵母を用いた場合はビール醸造中での発生を押さえることは困難である。ところが、遺伝子組換技術を利用し、ビール酵母の MET25 遺伝子を高発現させることにより、ビール醸造中の硫化水素の発生が抑えられることが報告されている（特開平 7-303475 号公報）。オフフレーバーのもう一つの例である VDK は分枝アミノ酸合成経路の中間代謝物であり、この場合も遺伝子組換技術を利用して酵母の ILV5

遺伝子を高発現させることにより、VDK の発生が抑えられることが報告されている (S.M. Mithieux and A.S. Weiss, Yeast 11:311-316, 1995)。

上述したように、遺伝子組換技術を用いてオフフレーバーの生成を抑えた酵母の育種は文献上いくつか知られているが、実プラントを用いて商業生産に利用されているものは皆無である。このようにせっかく育種された有用酵母が商業生産で利用されない一因として遺伝子組換酵母の DNA 中に存在する選択マーカー遺伝子や酵母以外の微生物に由来する DNA 断片の存在がある。

本発明では、選択マーカー遺伝子やその他の不要な DNA 配列の両端に FRT 配列を挿入することにより、形質転換後には不要な配列を除去することが可能となる。その結果、選択マーカー遺伝子の再利用が可能となり、選択マーカー遺伝子の種類が少ないビール酵母に複数個の遺伝子が導入できるようになることから、ビール酵母の育種の幅が格段に広がる。例えば、先に別々の育種例として示した ILV5 遺伝子と MET25 遺伝子同じ酵母細胞に別々に入れることができることになり、硫化水素と VDK の両方の生成を抑えた酵母の育種へつながる。また、本発明により得られる形質転換ビール酵母はビール酵母以外の DNA 配列を含まないことから、安全性の点で社会的受容も受けやすく、その結果、商業生産での利用が可能になる。

本発明がオフフレーバー除去の酵母育種だけでなく、醸造の効率化などの他の育種にも利用できることは明白である。例えば糖 (Y. Kodama, J. Am. Soc. Brew. Chem. 53:24-29, 1995) やアミノ酸のトランスポーターを遺伝子組換により強化することにより、発酵速度の向上が可能であり、また、浸透圧やアルコールなどのストレスに対する抵抗性を遺伝子工学的に付与することにより、高濃度のアルコールが製造できるようになることから効率的な醸造が可能になる。このような育種に本発明を利用することにより、オフフレーバー除去で記載したのと同じ効果が期待できる。

本発明では、1 倍体酵母のみならず、醸造用の 2 倍体酵母においても選択マーカー遺伝子の除去を効率よく行うことが確認され、実際のビール製造への利用が期待できる。

#### 【実施例】

以下に本発明を実施例に基づいて詳細に説明するが、これらの実施例は例示を目的として提供されているだけであって、本発明の範囲を限定することを意図しているものではない。実験の手順は特に記述しない限り、Sambrook らの Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に従った。

5

実施例 1： FRT 配列を利用した選択マーカー遺伝子の切り出し効率の検討

(1) 野生型 FRT 配列を含むプラスミドの構築

FRT 配列をプラスミドに導入するために以下の 4 種類のオリゴヌクレオチドを合成した（下線部が野生型 FRT 配列）。

10 FRT1-a

5'-TCGACGAAGTTCCTATACTACTTCTAGAGAATAGGAACTTCG-3' (配列番号：1 1)

FRT1-b

5'-AATTCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCG-3' (配列番号：1 2)

FRT101-a

5'-AGCTTGAAAGTTCCTATACTACTTCTAGAGAATAGGAACTTCGCATG-3' (配列番号：1 3)

FRT101-b

20 5'-CGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTC-3' (配列番号：1 4)

これらの合成 DNA の末端をリン酸化したのち、FRT1-a と FRT1-b、FRT101-a と FRT101-b をそれぞれアニーリングし、前者を pUC18 (東洋紡績株式会社) の制限酵素 EcoRI-SalII サイトに、つづいて後者を制限酵素 SphI-HindIII サイトに挿入し、プラスミド pFRT1-101 (図 1) を構築した。

25 選択マーカー遺伝子には、URA3 遺伝子を用いた。URA3 遺伝子をもつ株は Ura<sup>+</sup>の形質で選択でき、一方 URA3 遺伝子の除去された ura3 株は、5-フルオロオロチニ酸耐性で選択が可能であり、ura3 株を宿主とすれば、選択マーカー遺伝子 URA3 を有する株、除去された株ともに容易に判定できる。

別途、pUC18 を制限酵素 EcoRI 及び SphI で消化し、Blunting Kit (宝酒造(株))

製)で末端を平滑化したのちセルフライゲーションを行うことにより連結し、pUC18HSpを構築した。この制限酵素 HindIII サイトに YEp24 (Botstein,D.,et al., Gene, 8, 17, 1979) の URA3 遺伝子を含む 1.2kb の制限酵素 HindIII 断片を挿入し、pURA34 を構築した。(図 1)。

5 pFRT1-101 を制限酵素 SphI で消化後、Blunting Kit (宝酒造(株) 製) で末端を平滑化したのち、pURA34 を制限酵素 HindIII で消化後 Blunting Kit (宝酒造(株) 製) で末端を平滑化して得た約 1.2kb の断片と連結し、プラスミド pURA3FRT1-101 (図 1) を構築した。

10 pURA3FRT1-101 を制限酵素 EcoRI と HindIII で処理して得られる約 1.2kb の DNA 断片と pPRACer11 (図 1) を EcoRI と HindIII で処理して得られる約 4.2kb の断片を連結しプラスミド pPUFRT1-101 を構築した (図 1)。なお、pPRACer11 は、pBluescript SK<sup>+</sup> (東洋紡(株)) に、pHM153 から切り出した HindIII-SalI 断片 (J. Bacteriol., 172, 610-618, 1990) と、gap terminator と gap promoter (Appl. Microbiol. Biotechnol., 32, 129-133, 1989) に挟まれた Cer 耐性遺伝子 (PDR4 の約 1.7kb の DraI-KpnI 断片として得た : Gene, 101, 149-152, 1991) と、プロテアーゼA遺伝子 (PRA) としてプラスミド CBZ1 の SacI-EcoRI 断片及び HindIII-XhoI 断片 (Mol. Cell. Biol., 6, 2500-2510, 1986) とを挿入することによって構築した。

20 (2) 選択マーカー遺伝子から見て外側にあたる数塩基が野生型 FRT 配列と比較し欠失した FRT 配列を含むプラスミドの構築

次に、pPUFRT1-101 の野生型 FRT を、合成 DNA により作成された種々の長さの FRT 配列に置き換えたプラスミドを作成する。用いた合成 DNA の配列は以下に示す通りである。

FRT2-a : 5'-CTAGAGAACATAGGAACG-3' (配列番号 : 1 5)

25 FRT2-b : 5'-AATTTCGTTCCCTATTCT-3' (配列番号 : 1 6)

FRT102-a : 5'-AGCTTGTTCCTATACTTT-3' (配列番号 : 1 7)

FRT102-b : 5'-CTAGAAAGTATAGGAACA-3' (配列番号 : 1 8)

FRT3-a : 5'-CTAGAGAACATAGGAG-3' (配列番号 : 1 9)

FRT3-b : 5'-AATTCTCCTATTCT-3' (配列番号 : 2 0)

FRT103-a : 5'-AGCTTCCCTATACTTT-3' (配列番号 : 21)

FRT103-b : 5'-CTAGAAAAGTATAGGAA-3' (配列番号 : 22)

FRT4-a : 5'-CTAGAGAATAGG-3' (配列番号 : 23)

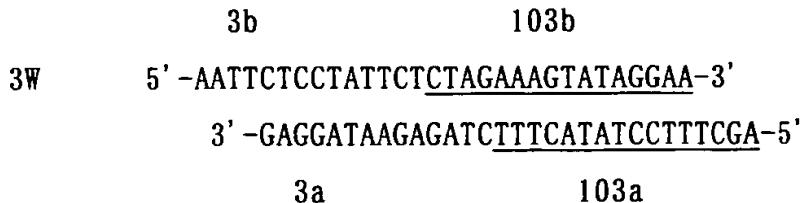
FRT4-b : 5'-AATTCCCTATTCT-3' (配列番号 : 24)

5 FRT104-a : 5'-AGCTTCTATACTTT-3' (配列番号 : 25)

FRT104-b : 5'-CTAGAAAAGTATAGA-3' (配列番号 : 26)

上記の配列は合成 DNA の 5'末端をリン酸化したのち、FRT2-a と FRT2-b と  
FRT102-a と FRT102-b、FRT3-a と FRT3-b と FRT103-a と FRT103-b、FRT4-a  
と FRT4-b と FRT104-a と FRT104-b の組み合わせでアニーリングし、それぞれ  
10 pUC18 の EcoRI-HindIII サイトに挿入し、プラスミド pFRT2w、pFRT3w (図  
2)、pFRT4w を構築した。なお、上記工程ではそれぞれ 4 種の合成 DNA をア  
ニーリングして、両端が欠失した W 配列を作製してプラスミドに挿入したが、例  
えば FRT3-a と FRT3-b と FRT103-a と FRT103-b の組み合わせで得られる W 配  
列を以下に示す。

15



20

これらプラスミド (pFRT2w、pFRT3w、pFRT4w) の XbaI サイトにプラスミド  
pURA3FRT1-101 を XbaI で処理して得られる約 1.2kb の断片をそれぞれ挿入し、  
プラスミド pURA3FRT2-102、pURA3FRT3-103 (図 2)、pURA3FRT4-104  
を構築した。これらのプラスミドは同じ向きに並べた 1 対の FRT 配列の間に選  
25 択マーカー遺伝子 URA3 が配置されており、各々の FRT 配列は、選択マーカー  
遺伝子から見て外側にあたる数残基が野生型 FRT 配列と比較し欠失したもの  
である。

このようにして得られた FRT 配列およびその組み合わせで切り出し後に生じ  
る FRT 配列を図 3 にまとめた。

これらのプラスミドをそれぞれ EcoRI と HindIII で処理して得られる約 1.2kb の断片と pPRACer11 を EcoRI と HindIII で処理して得られる約 4.2kb の断片を連結し、プラスミド pPUFRT2-102、pPUFRT3-103（図 2）、pPUFRT4-104 を構築した。

### 5 (3) In vivo における組換え頻度の検討

一倍体酵母として R27-7C-1C 株(MAT  $\alpha$  trp1 leu2 his3 ura3)を用いた。酵母の形質転換はリチウムクロライドを用いた方法 (Kodama,Y., et al., J. Am. Soc. Brew. Chem.,53, 24-29, 1995) により行うことが可能である。

pPUFRT1-101、pPUFRT2-102、pPUFRT3-103、pPUFRT4-104、それ  
10 ぞれ約 10  $\mu$ g を KpnI と SacI で処理し、エタノール沈殿後、10  $\mu$ l の TE 緩衝液に溶解してその全量を酵母の組換えに使用し、Ura<sup>+</sup>に形質転換した株を選択した。すなわち、Ura<sup>+</sup>選択培地 (Yeast Nitrogen Base [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>](DIFCO 社)、グルコース 2 %、ロイシン 0.01%、トリプトファン 0.01%、寒天 2 %) に上記形質転換操作をした酵母を塗布し、30℃で 72 時間インキュベートする。

15 こうして得られた形質転換株を YPD 液体培地で 30℃で一晩培養し、R27-7C-1C 株のもつ 2  $\mu$ m プラスミド上の FLP 遺伝子より発現される組換え酵素による、染色体上に導入した 2 個の FRT 配列間での組換えを誘導した。

培養液を無菌水で適当に希釈し、そのうち 100  $\mu$ l を YPD 寒天培地および 5-フルオロオロチン酸を含む寒天培地 (Yeast Nitrogen Base [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>](DIFCO 社)、グルコース 2 %、ウラシル 0.005%、ロイシン 0.01%、トリプトファン 0.01%、5-フルオロオロチン酸 0.1%、寒天 2 %) にそれぞれ塗布し、30℃で 48 時間培養したのち、出現したコロニーの数を数えた。5-フルオロオロチン酸を含む培地で増殖できる細胞が組換えが起こった細胞である。結果を表 1 に示した。

【表 1】

25

FRT 配列	組換え頻度
FRT1-FRT101(野生型)	1/3 - 1/2
FRT2-FRT102	1/10 <sup>3</sup> - 1/10 <sup>4</sup>
FRT3-FRT103	1/10 <sup>5</sup> - 1/10 <sup>6</sup>
FRT4-FRT104	< 1/10 <sup>7</sup>

表1に示す通り、*in vivo*における組換え効率は、野生型 FRT 配列の組み合わせでも 1/2 以下であり、欠失が多くなるにしたがってその頻度が急激に低下することが分かった。

5

実施例2：FRT配列とGIN11を組み合わせた選択マーカー遺伝子の切り出し効率の検討

(1) プラスミド pPUGINFR3-103 の構築

GIN11 を有するプラスミドを作製するために、2種類のオリゴヌクレオチドを合成した。

GIN-1 : 5'- TGGATCCGGAATTTCGACGGATCAATAAC-3' (配列番号: 27)

GIN-2 : 5'-TTCTGCAGACTAGATGCACTCATATCATTATGCAC-3' (配列番号: 28)

これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとし、プラスミド pAUR135 (宝酒造(株))を鋳型として PCR を行うことにより得られた約 0.7kb の断片を BamHI と PstI で処理し、pHM999 (特開平 10-66587 号公報) を EcoRI と BamHI で処理して得られる GAL1 プロモーターを含む約 0.8kb の断片とともに、pUC19 の EcoRI-PstI サイトに挿入することにより、GIN11M86 (宝酒造(株) 製) を GAL1 プロモーターに連結したプラスミド pPGAL1GIN (図4) を作製した。

これを EcoRI と PstI で処理して得られる約 1.5kb の断片の末端を Blunting Kit (宝酒造(株) 製) で平滑化したのち、pPUFRT3-103 の SmaI サイトに挿入し、プラスミド pPUGINFR3-103 を得た。 (図4)

(2) 研究室株を用いた選択マーカー遺伝子の除去

一倍体酵母として R27-7C-1C 株(MAT  $\alpha$  trp1 leu2 his3 ura3)を用いた。プラスミド pPUGINFR3-103 を KpnI と SacI で処理して得られる約 4.1kb の DNA 断片 (約 10  $\mu$ g) を酵母の組換えに使用し、形質転換体の Ura<sup>+</sup>の形質により選択した。

得られた形質転換体を非選択培地で培養すると細胞内にある Flp 組換え酵素の働きによって FRT 配列間で組換えをおこす細胞がある。一方、FRT 配列間で組

換えがおこらなかった細胞はガラクトースを含む培地で培養することにより GIN11M86 の発現が誘導され増殖が阻害される。したがって、ガラクトースを含む培地で増殖できる細胞は染色体上に挿入された FRT 配列間で組換えがおこり、その間に挿入されていた選択マーカー遺伝子および GAL1 プロモーターに連結された GIN11M86 が除去されたものである。

得られた形質転換体を 10ml の YPGal (ペプトン 2 %、酵母エキス 1 %、ガラクトース 2 %) 液体培地にて 30℃、24 時間培養し、FRT 配列間での組換えをおこすとともに、GIN11M86 の発現を誘導した。培養液を適当に希釀し、YPGal 寒天培地に塗付し 30℃で 48 時間培養した。得られたコロニーのうち 100 株を 5-10 フルオロオロチニ酸寒天培地および Ura' 選択寒天培地で 30℃、48 時間培養した。その結果、すべての株が Ura' 選択寒天培地でのみ生育できなかつた。つまり、YPGal 寒天培地で生育できた株は、すべて URA3 遺伝子が除去されたことを示している。

### 15 実施例 3：薬剤耐性選択マーカー遺伝子の除去

#### (1) プラスミド pPPGINFRT3 の構築

選択マーカー遺伝子として PDR 4 (セルレニンおよびシクロヘキシミド耐性遺伝子) を用い、ガラクトースにより誘導される GAL1 プロモーターにつないだ GIN11M86 とともに部位特異的組換え配列 (FRT3,FRT103) で挟んだ。プラスミド pPGAL1GIN を制限酵素 EcoRI で処理し Blunting Kit (宝酒造 (株)) で末端を平滑化したのち制限酵素 PstI で処理して得られる約 1.5kb の断片を、プラスミド pFRT1-101 の HincII-PstI サイトに挿入し、プラスミド pFRT1GIN(図 5 A) を構築した。pFRT1GIN を制限酵素 XbaI で処理して得られる約 1.5kb の断片を pFRT3w の XbaI サイトに挿入し、プラスミド pFRT3-103-GIN を得た(図 25 5 A)。

pPRACer11 を SphI と SalI で処理して得られる約 2.7kb の断片を pUC18 の SphI-SalI サイトに挿入したあと SalI で処理し、Blunting Kit で末端を平滑化して pPstI リンカー (東洋紡績 (株)) を挿入しプラスミド pPGAPDHPDR4 を構築した(図 5 A)。pPGAPDHPDR4 を SphI と PstI で処理して得られる約 2.7kb

の断片を pFRT3-103-GIN の SphI-PstI サイトに挿入し、プラスミド pFRT3-103-GINPDR4 を構築した（図 5 B）。これを EcoRI と HindIII で処理して得られる約 4.2kb の断片と pPRACer11 を EcoRI と HindIII で処理して得られる約 4.2kb の断片を連結し、プラスミド pPPGINFRT3（図 5 B）を構築した。

5 このプラスミドでは FRT3 と FRT103 の間に、ガラクトースで誘導できるプロモーターに連結された GIN11 と、酵母の構成的なプロモーターの一つであるグリセロアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素のプロモーターに連結された PDR4 遺伝子が挿入されている。

#### （2）研究室株を用いた選択マーカー遺伝子の除去

10 プラスミド pPPGINFRT3 約  $10\mu\text{g}$  を制限酵素 KpnI と SacI で処理し、エタノール沈殿後、 $10\mu\text{l}$  の TE 緩衝液に溶解してその全量を形質転換に使用した。宿主として一倍体 R27-7C-1C 株を用い、リチュウムクロライドを用いた方法により形質転換した。その後、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$  のシクロヘキシミドを含むYPD プレートに塗付し、30℃で 2 日間培養してシクロヘキシミド耐性株を選択した。

15 選択マーカー遺伝子を切り出すために YPGal 液体培地 10ml に形質転換株を 1 白金耳植菌し、30℃で 24 時間振とう培養した。適当に希釀したあと YPGal プレートに塗付し 30℃で 2 日間培養した。得られたコロニーを任意に 100 株選択し、シクロヘキシミドを含むYPD プレートにレプリカしてシクロヘキシミド耐性を調べた。

20 その結果、100 株中 100 株がシクロヘキシミド感受性であり、これらの株では部位特異的組換えにより選択マーカー遺伝子が切り出されたと考えられる。

#### （3）醸造用酵母を用いた選択マーカー遺伝子の除去

##### （3-1）1 回目の形質転換と選択マーカー遺伝子の除去

形質転換体の作出は研究室株を用いた場合と同じ方法で行った。宿主としては 25 2 倍体の野生型酵母 AY-1 株 (MAT a/α 野生型) を用いたが、二倍以上の倍数を持つ酵母であればいずれの酵母を用いても良い。

得られた形質転換体のコロニーを 10ml の YPGal 液体培地に 1 白金耳植菌し、30℃で 24 時間培養した。適当に希釀したあと YPGal プレートに塗付し 30℃で 2 日間培養した。得られたコロニーを任意に 100 株選択し、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$  のシクロヘ

キシミドを含むYPD寒天培地にレプリカしてシクロヘキシミド耐性を調べた。その結果、100株中100株がシクロヘキシミドを含む寒天培地では生育できず、これらの株では部位特異的組換えにより選択マーカー遺伝子が切り出されたと考えられる。

5 (3-2) 2回目の形質転換と選択マーカー遺伝子の除去

上記操作によって得られた形質転換後に選択マーカー遺伝子が除去された株から1株をもとに、2回目の形質転換を行った。形質転換および選択マーカー遺伝子の除去操作は1回目と同様に行った。

その結果、100株中100株がシクロヘキシミドを含む寒天培地では生育できず、10これらの株では部位特異的組換えにより選択マーカー遺伝子が切り出されたと考えられる。

## 請求の範囲

1.

(1) 選択マークー遺伝子、

5 (2) ガラクトースで誘導可能な増殖阻害配列、

(3) (1) と (2) とを挟む同方向に配置された 1 対の FRT 配列、及び

(4) (3) の両側に配置される酵母染色体 DNA との間で組換え可能な DNA 断片、

からなる DNA 構成物であって、該 FRT 配列が次の配列：

10

5' - GAAGTTCCCTATAAC TTTCTAGA GAATAGGAACTTC - 3' (配列番号：1)

逆向き反復      スペーサー      逆向き反復

配列 (1)      配列      配列 (2)

15 を含んで成るか又はこれと実質的に同一な配列を含んで成り、但し該 1 対の FRT 配列のそれぞれは、間に挟まれた選択マークー遺伝子と増殖阻害配列から遠位の側の逆向き反復配列において、スペーサー配列から遠位の側において少なくとも 1 個以上、6 個以下の塩基が欠失していることを特徴とする DNA 構成物。

20 2. 酵母染色体 DNA との間で組換え可能な DNA 断片と、その近傍にある FRT 配列の間に、目的遺伝子が挿入されている、請求項 1 に記載の DNA 構成物。

3. サッカロマイセス属酵母の形質転換方法において、

(1) 請求項 1 記載の DNA 構成物を酵母細胞に導入し、該 DNA 構成物に存在する、酵母染色体 DNA との間で組換え可能な DNA 断片と、酵母染色体 DNA との間の組換えにより、該 DNA 構成物を酵母染色体に組み込み、

25 (2) 該 DNA 構成物に含まれている選択マークー遺伝子の発現により、該 DNA 構成物が導入された酵母細胞を選択し、

(3) 非選択培地で培養し、該 DNA 構成物に含まれる 1 対の FRT 配列間において組換えを起こさせることにより、選択マークー遺伝子を切除し、

(4) ガラクトースを含む培地で培養し、増殖可能な酵母細胞を選択する、

ことを特徴とするサッカロマイセス属酵母の形質転換方法。

4. 酵母染色体 DNA との間で組換え可能な DNA 断片と、その近傍にある FRT 配列との間に目的遺伝子が挿入されている DNA 構成物を用い、該目的遺伝子を酵母染色体に挿入することを特徴とする、請求項 3 記載のサッカロマイセス属酵母の形質転換方法。

5 5. 請求項 4 記載の方法を複数回行うことにより、複数の目的遺伝子を導入することを特徴とする、請求項 4 記載のサッカロマイセス属酵母の形質転換方法。

6 6. 請求項 3～5 のいずれかに記載の方法によって形質転換されたサッカロマイセス属酵母。

10 7. 請求項 6 記載のサッカロマイセス属酵母を用いることを特徴とするビールの製造方法。

8. 請求項 7 の方法により得られるビール。



図 1

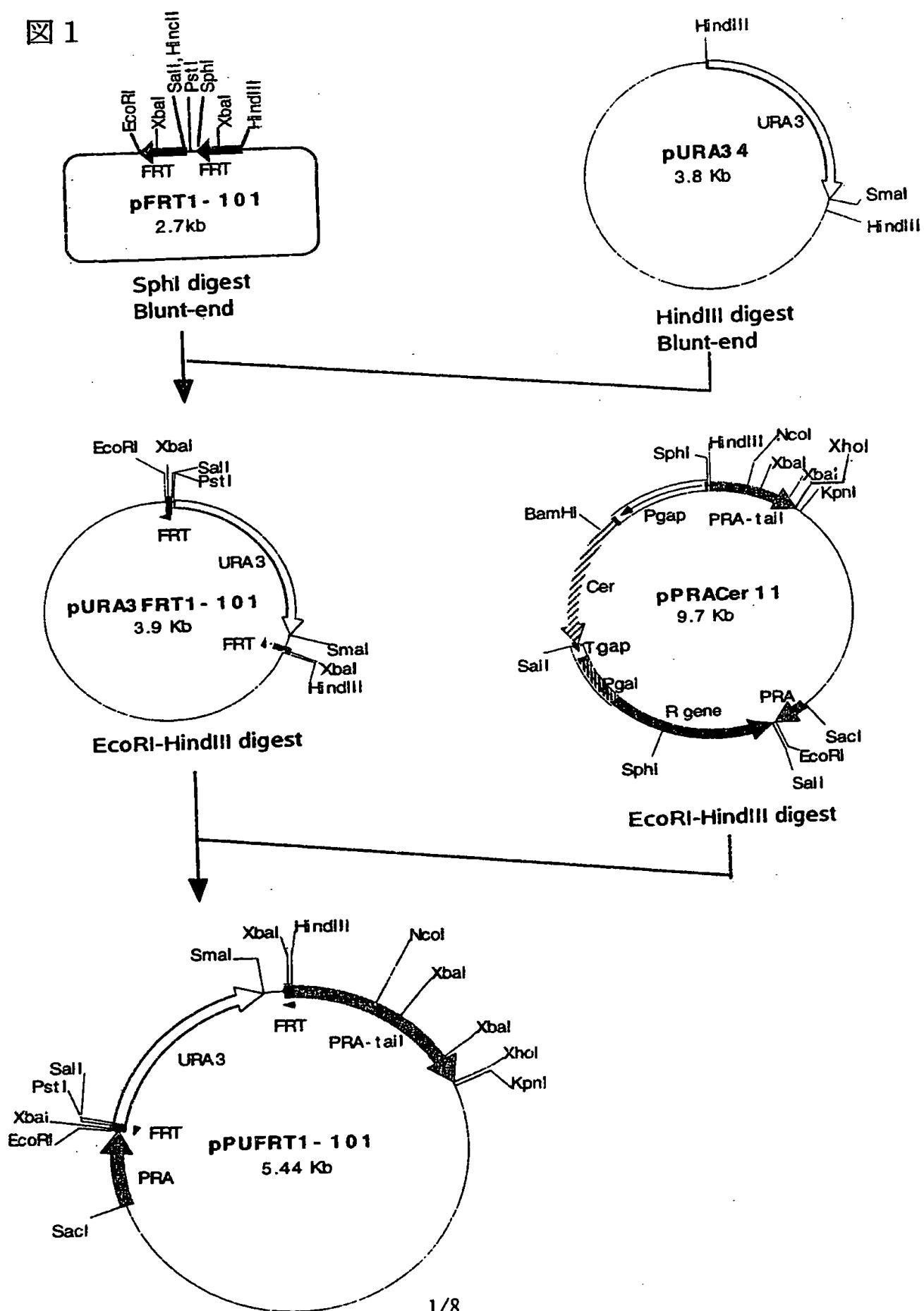
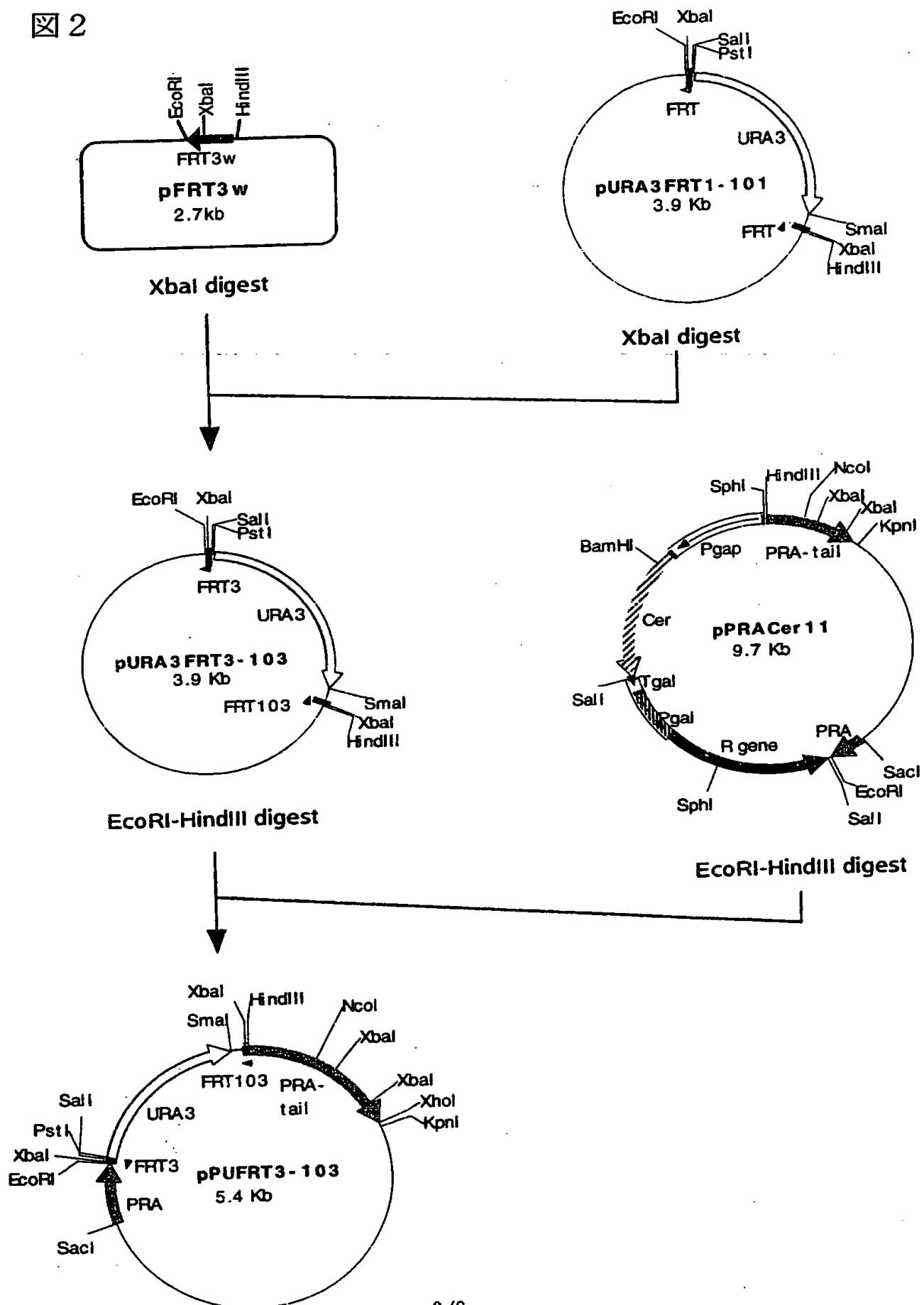




図 2





## 図 3

FRT 5'-GAAGTTCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAACCTTC-3' (配列番号 : 1)

FRT2 5'-GAAGTTCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAAC-3' (配列番号 : 2)  
 FRT102 5'-GTTCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAACCTTC-3' (配列番号 : 3)

↓Recombination

FRT2W 5'-GTTCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAAC-3' (配列番号 : 4)

FRT3 5'-GAAGTTCTATAC TTTCTAGA GAATAGGA-3' (配列番号 : 5)  
 FRT103 5'-TTTCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAACCTTC-3' (配列番号 : 6)

↓Recombination

FRT3W 5'-TTTCTATAC TTTCTAGA GAATAGGA-3' (配列番号 : 7)

FRT4 5'-GAAGTTCTATAC TTTCTAGA GAATAG-3' (配列番号 : 8)  
 FRT104 5'-CTATAC TTTCTAGA GAATAGGAACCTTC-3' (配列番号 : 9)

↓Recombination

FRT4W 5'-CTATAC TTTCTAGA GAATAG-3' (配列番号 : 10)



图 4

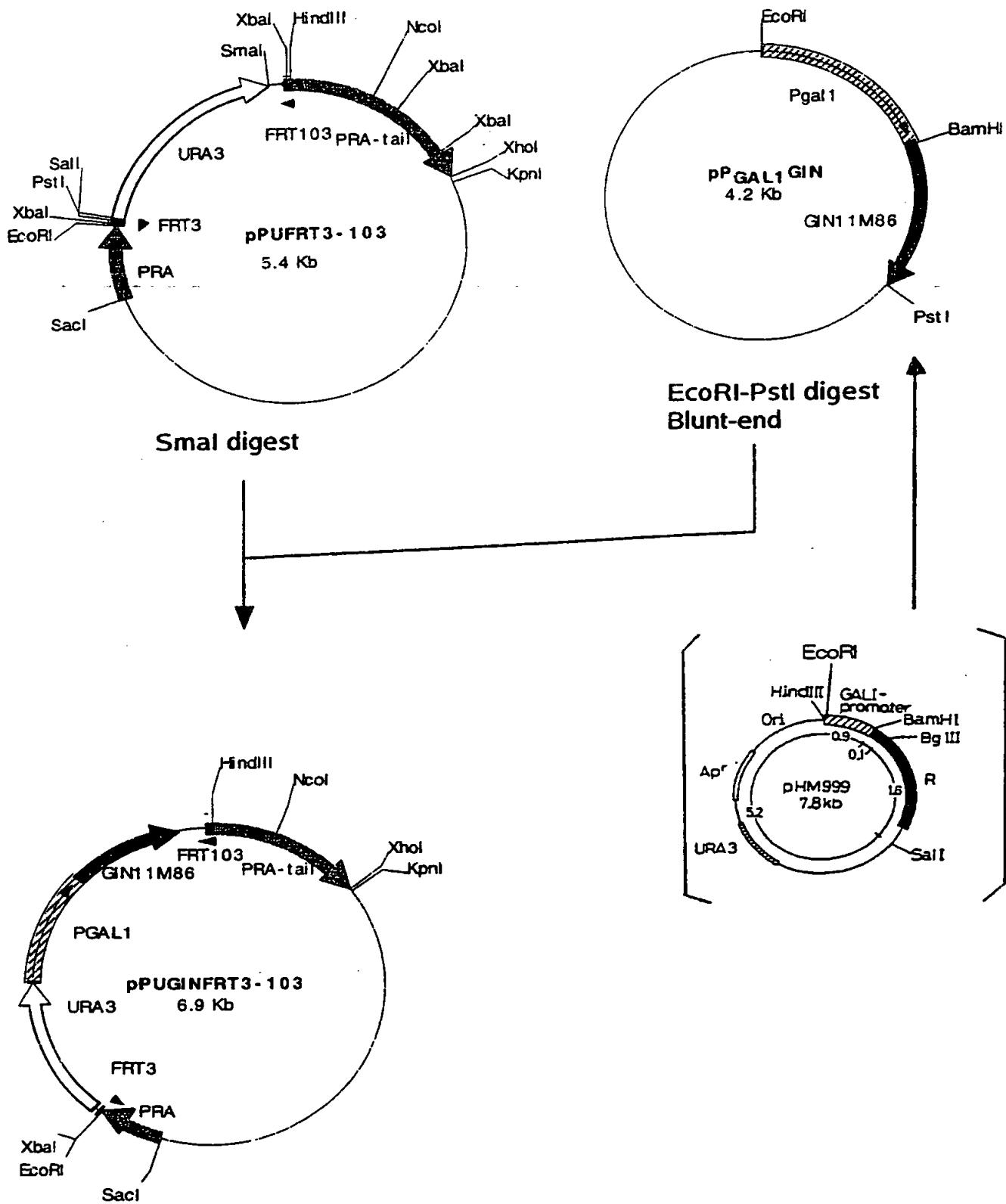




図 5 A

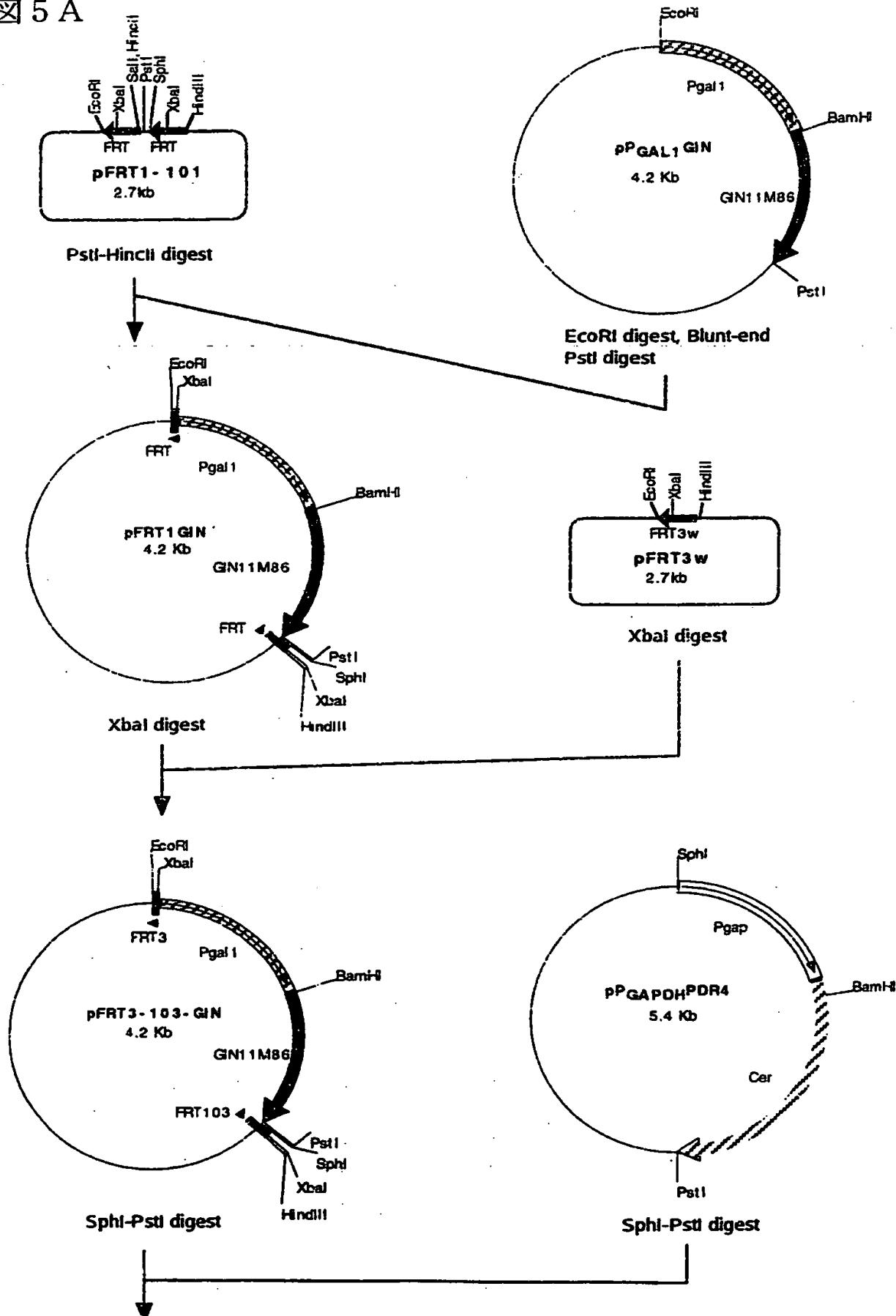




図 5 B

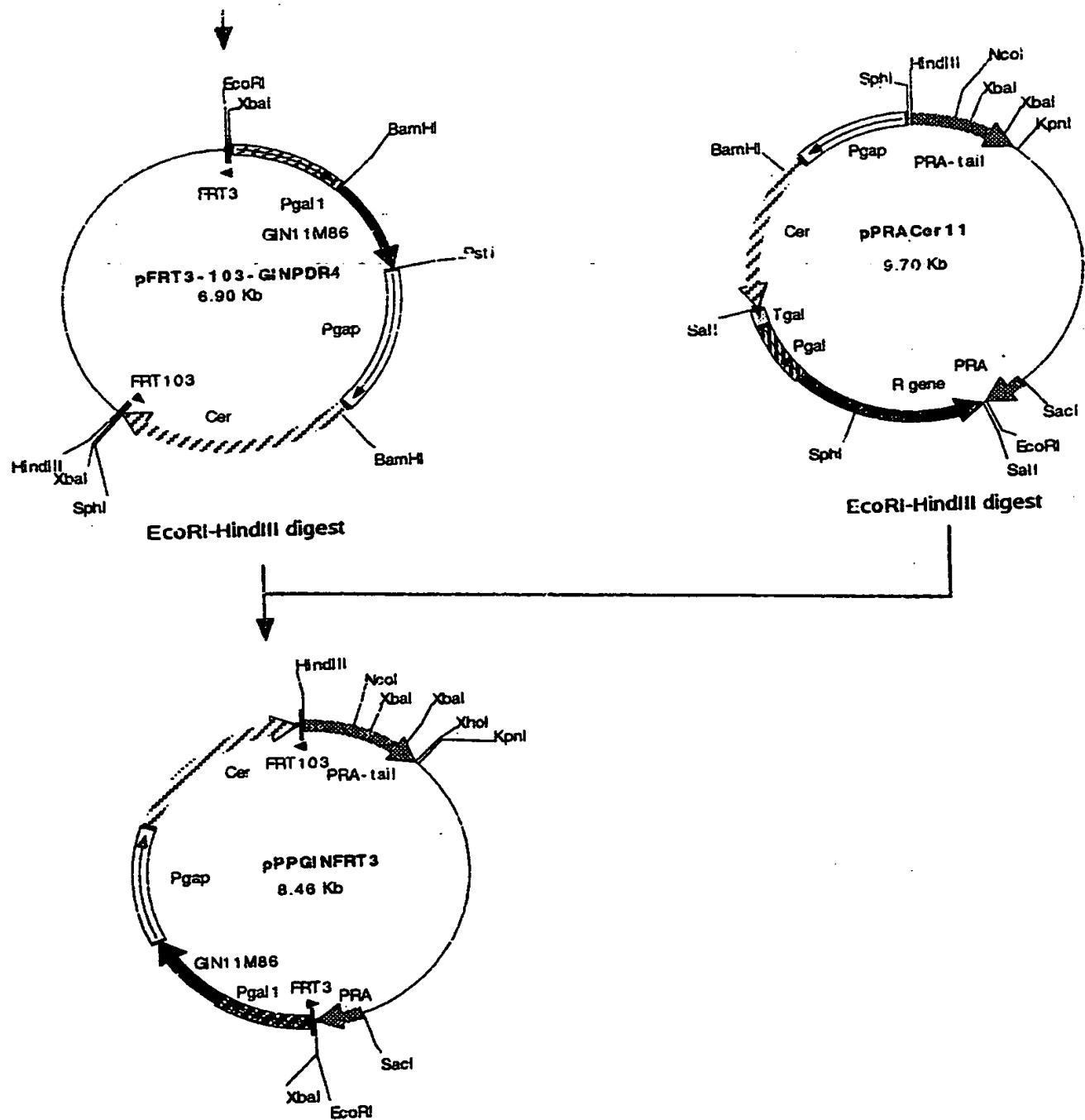




図 6

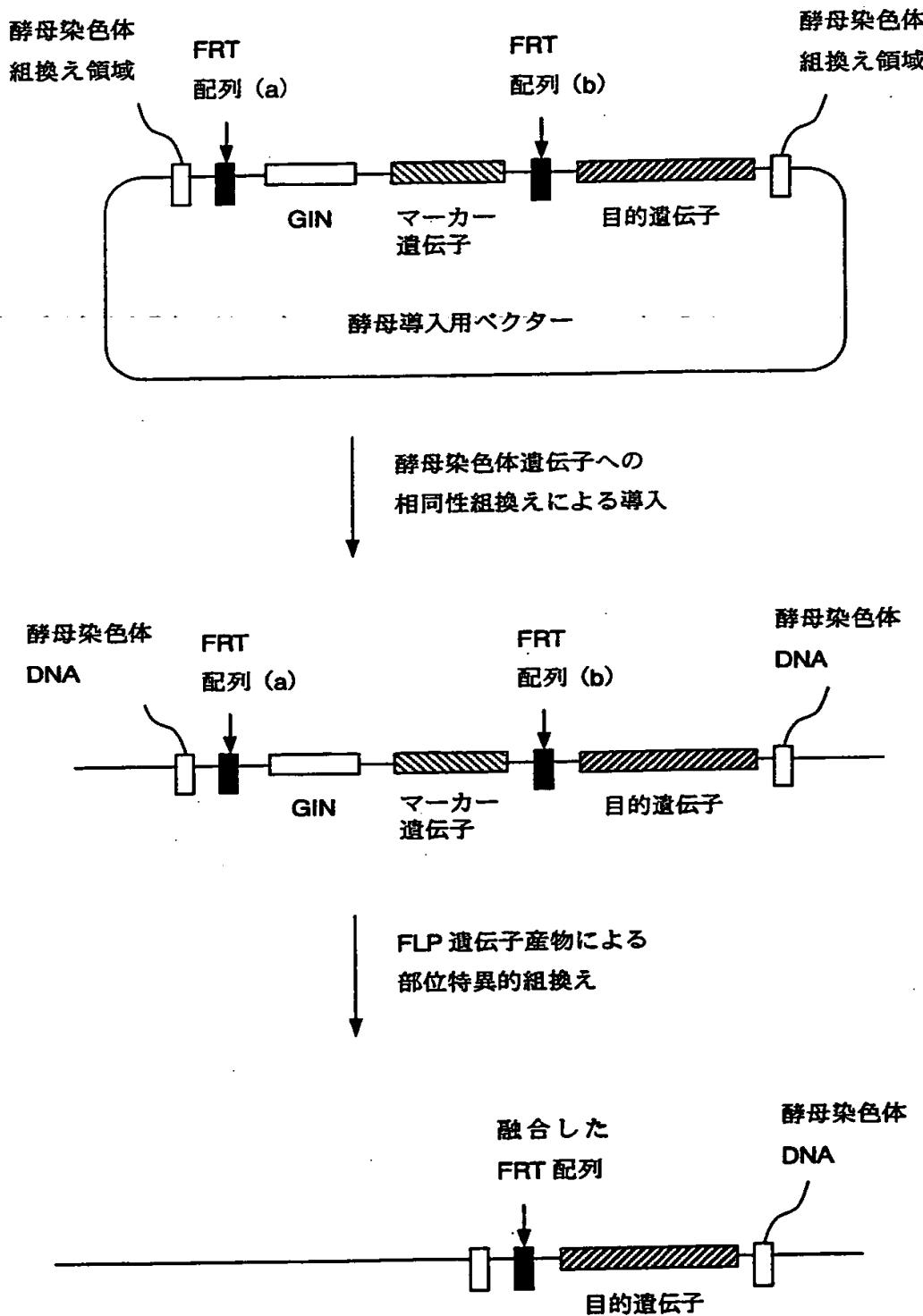
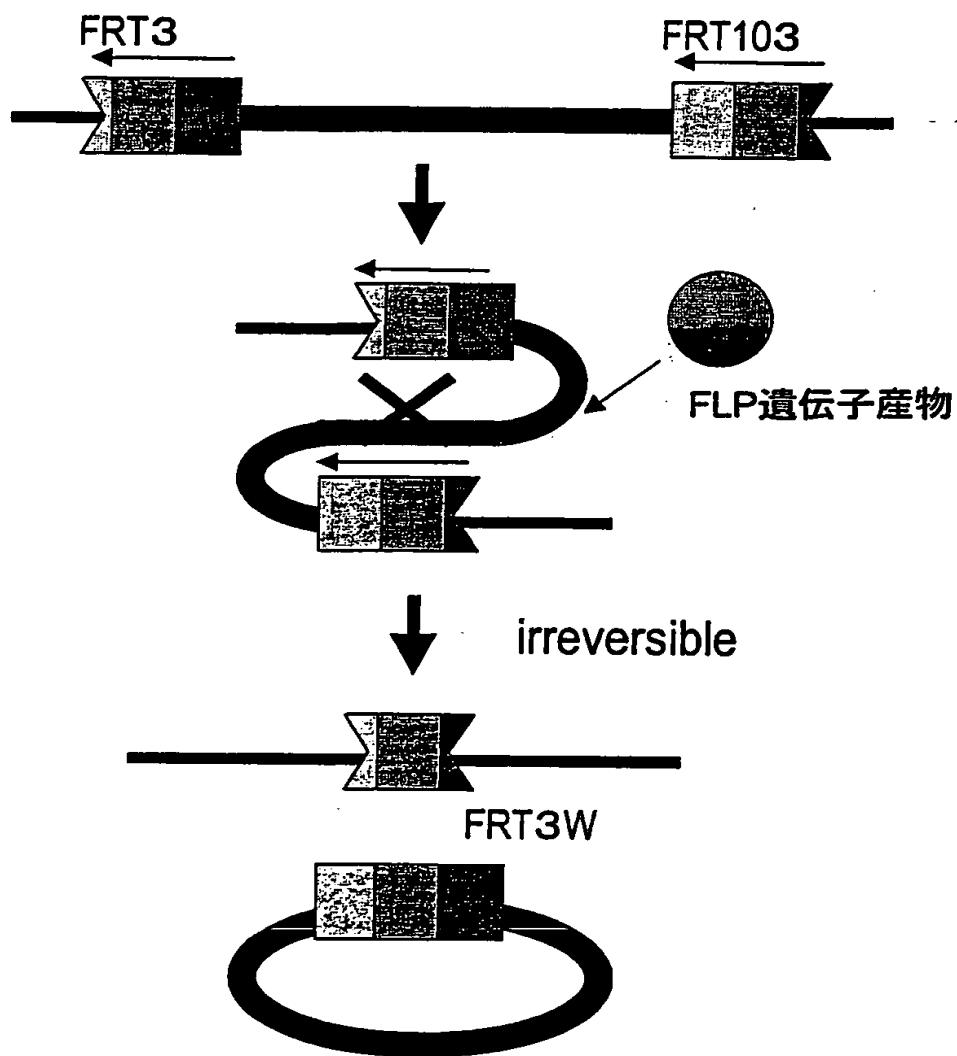




図 7





## 【配列表】

<110> サントリー株式会社

<120> 酵母の育種方法

<130> YCT-542

5 <160> 28

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

10 <213> Artificial Sequence

<400> 1

gaaggttccta tactttctag agaataggaa cttc

34

<210> 2

15 <211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

gaaggttccta tacitttctag agaataggaa c

31

20

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25 <400> 3

gttcctatac tttcttagaga ataggaactt c

31

<210> 4

<211> 28



<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 4  
gttcctatac ttcttagaga ataggaac 28  
5  
<210> 5  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
10 <400> 5  
gaagtcccta tactttctag agaatagga 29  
  
<210> 6  
<211> 30  
15 <212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 6  
ttcctatact ttcttagagaa taggaacttc 30  
  
20 <210> 7  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 7  
25 ttcctatact ttcttagagaa tagga 25  
  
<210> 8  
<211> 27  
<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<400> 8

gaagtccata tacttcttag agaatag

27

5 <210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

10 ctatactttc tagagaatag gaacttc

27

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<400> 10

ctatactttc tagagaatag

20

<210> 11

20 <211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

tgcacgaagt tcctatactt tctagagaat aggaacctcg

40

25

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<400> 12

aattcgaagt tcctatttc tagaaagttt aggaacttcg

40

<210> 13

5 <211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

agcttgaagt tcctatacgt tctagagaat aggaacttcg catg

44

10

<210> 14

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15 <400> 14

cgaaggttcct attctctaga aagtatagga actica

36

<210> 15

<211> 16

20 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

ctagagaata ggaacg

16

25 <210> 16

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16



aattcgttcc tattct

16

<210> 17

<211> 18

5 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 17

agcttttgttcc tataacttt

18

10 <210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 18

15 ctagaaagta taggaaca

18

<210> 19

<211> 14

<212> DNA

20 <213> Artificial Sequence

<400> 19

ctagagaata ggag

14

<210> 20

25 <211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 20

aatttccttca ttct

14



<210> 21

<211> 16

<212> DNA

5 <213> Artificial Sequence

<400> 21

agctttccta tacttt

16

<210> 22

10 <211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 22

ctagaaagta taggaa

16

15

<210> 23

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20 <400> 23

ctagagaata gg

12

<210> 24

<211> 12

25 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 24

aattcctatt ct

12



<210> 25  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
5 <400> 25  
agctttctata cttt 14

<210> 26  
<211> 14  
10 <212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 26  
ctagaaaatgtatc 14

15 <210> 27  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 27  
20 tggatccgga atttcgacgg atcaataac 29

<210> 28  
<211> 35  
<212> DNA  
25 <213> Artificial Sequence  
<400> 28  
ttctgcagac tagatgcact cataatcatta tgcac 35



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07491

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/11, 1/19, C12C11/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00-15/90, C12C11/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS/MEDLINE/WPI (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	EP, 814165, A2 (SUNTORY LTD), 19 December, 1997 (19.12.97), Full text & JP, 10-66587, A & US, 5965444, A	1-8
Y	Yeast, 15(4), March 1999 Storici F. et al., "A 2-microm DNA-based marker recycling system for multiple gene disruption in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ", pp.271-283	1-8
Y	Yeast, 15(1), Jan.1999 Kawahata M., "A positive selection for plasmid loss in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> using galactose-inducible growth inhibitory sequences", pp.1-10	1-8
X Y A	EP, 699748, A (SUNTORY LTD), 06 March, 1996 (06.03.96), Full text & JP, 7-303475, A & AU, 9520022, A	8 7 1-6

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
16 January, 2001 (16.01.01)Date of mailing of the international search report  
20 February, 2001 (20.02.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/07491

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C1' C12N15/11, 1/19, C12C11/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1' C12N15/00-15/90, C12C11/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPI(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	EP, 814165, A2 (SUNTORY LTD) 19. 12月. 1997 (19. 12. 97) 全文 & JP, 10-66587, A & US, 5965444, A	1-8

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 01. 01

国際調査報告の発送日

20.02.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

鈴木 恵理子

4B 9838

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) .	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Yeast, 15(4), Mar. 1999 Storici F., et al., "A 2-microm DNA-based marker recycling system for multiple gene disruption in the yeast Saccharomyces cerevisiae", p. 271-283	1-8
Y	Yeast, 15(1), Jan. 1999 Kawahata M., "A positive selection for plasmid loss in Saccharomyces cerevisiae using galactose-inducible growth inhibitory sequences", p. 1-10	1-8
X	E P, 6 9 9 7 4 8, A (SUNTORY LTD)	8
Y	6. 3月. 1996 (06. 03. 96)	7
A	全文 & JP, 7-303475, A & AU, 9520022, A	1-6

E P

U S

P C T

## 特許協力条約

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
 [PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 Y C T - 5 4 2	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 0 0 / 0 7 4 9 1	国際出願日 (日.月.年) 26. 10. 00	優先日 (日.月.年), 26. 10. 99
出願人(氏名又は名称) サントリー株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。この写しは国際事務局にも送付される。

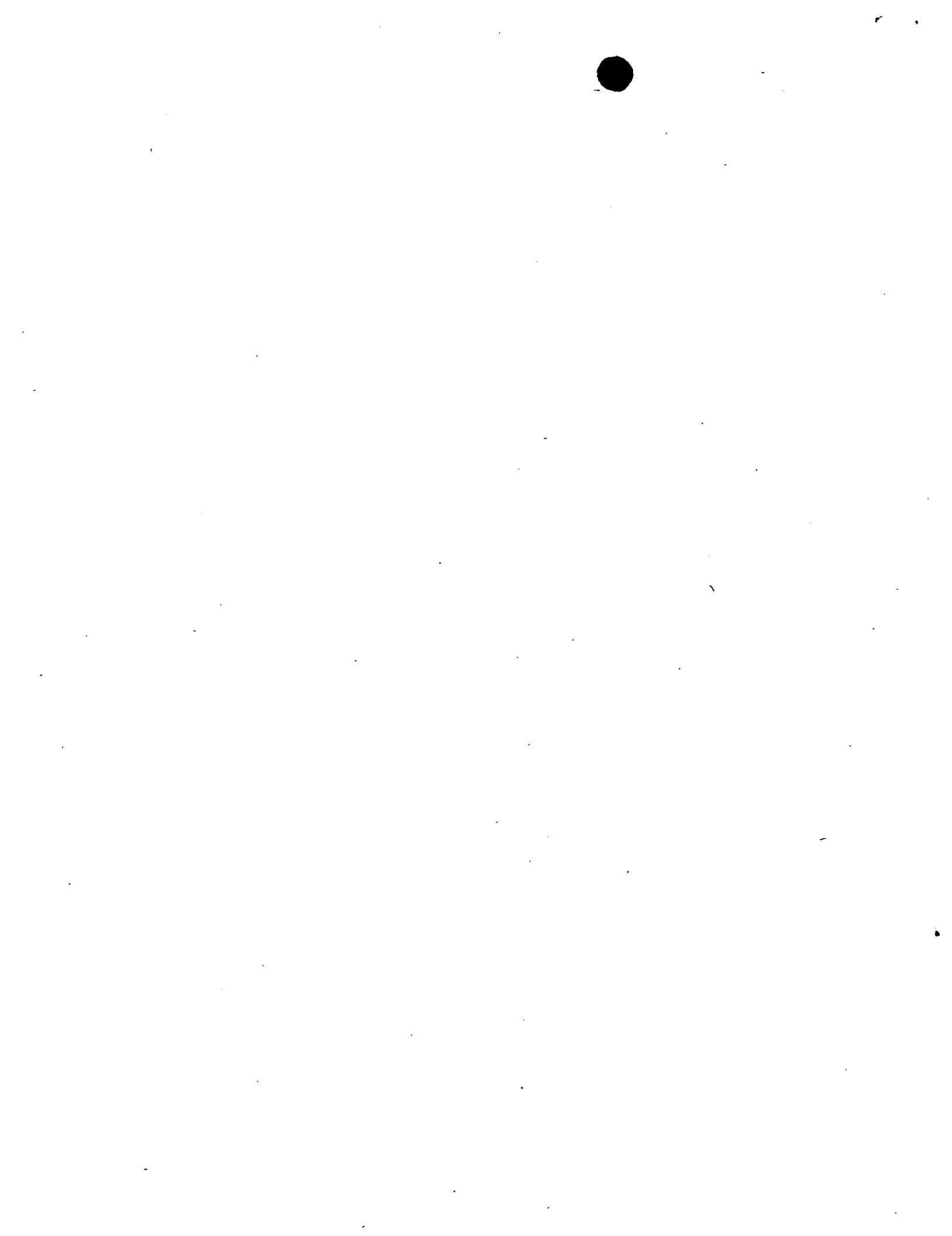
この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎
  - a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
  この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
  - b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
  この国際出願に含まれる書面による配列表
  この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
  出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
  出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
  出願後に提出した書面による配列表が、出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
  書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。
2.  請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。
3.  発明の單一性が欠如している(第II欄参照)。
4. 発明の名称は
  出願人が出したものを承認する。
  次に示すように国際調査機関が作成した。

---

5. 要約は
  出願人が出したものを承認する。
  第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。
6. 要約書とともに公表される図は、  
 第 6 図とする。 出願人が示したとおりである.  なし
  - 出願人は図を示さなかった。
  - 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N15/11, 1/19, C12C11/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N15/00-15/90, C12C11/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPI(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	EP, 814165, A2 (SUNTORY LTD) 19. 12月. 1997 (19. 12. 97) 全文 & JP, 10-66587, A & US, 5965444, A	1-8

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 01. 01

国際調査報告の発送日

20. 02. 01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

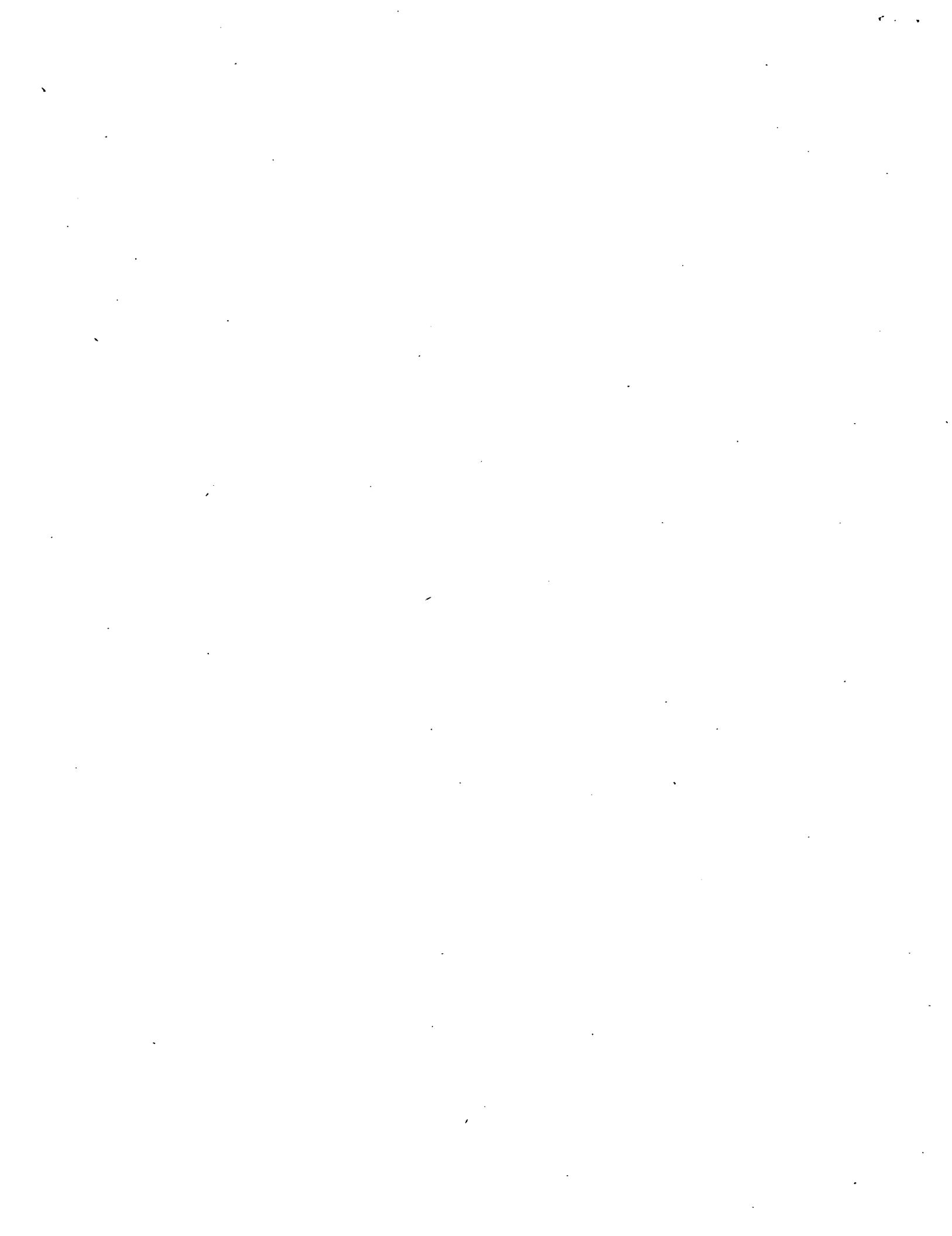
鈴木 恵理子

印 4B 9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



C(続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	Yeast, 15(4), Mar. 1999 Storici F., et al., "A 2-microm DNA-based marker recycling system for multiple gene disruption in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ", p. 271-283	1-8
Y	Yeast, 15(1), Jan. 1999 Kawahata M., "A positive selection for plasmid loss in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> using galactose-inducible growth inhibitory sequences", p. 1-10	1-8
X	EP, 699748, A (SUNTORY LTD)	8
Y	6. 3月. 1996 (06. 03. 96)	7
A	全文 & JP, 7-303475, A & AU, 9520022, A	1-6



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07491

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl' C12N15/11, 1/19, C12C11/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl' C12N15/00-15/90, C12C11/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS/MEDLINE/WPI (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	EP, 814165, A2 (SUNTORY LTD), 19 December, 1997 (19.12.97), Full text & JP, 10-66587, A & US, 5965444, A	1-8
Y	Yeast, 15(4), March 1999 Storici F. et al., "A 2-microm DNA-based marker recycling system for multiple gene disruption in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ", pp.271-283	1-8
Y	Yeast, 15(1), Jan.1999 Kawahata M., "A positive selection for plasmid loss in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> using galactose-inducible growth inhibitory sequences"; pp.1-10	1-8
X	EP, 699748, A (SUNTORY LTD), 06 March, 1996 (06.03.96), Full text	8
Y A	& JP, 7-303475, A & AU, 9520022, A	7 1-6

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
16 January, 2001 (16.01.01)Date of mailing of the international search report  
20 February, 2001 (20.02.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

